

## ВЛИЯНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ КОСТНОГО МОЗГА ОБЛУЧЕННЫХ РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННОГО МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА

*Н.Н. Попов<sup>1</sup>, Е.А. Романова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

<sup>2</sup>Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины», г. Харьков

### РЕЗЮМЕ

Целью работы было изучение влияния обогащения аллогенного миелотрансплантата В-лимфоцитами на восстановление гемопоэза и иммуногенеза облученных реципиентов и возможность развития у них РТПХ. Показано, что применение В-лимфоцитов совместно с миелокариоцитами оказывает стимулирующий эффект на восстановление КОЕ, ядродержащих клеток, лимфоцитов костного мозга летально облученных реципиентов. Добавление В-лимфоцитов к аллогенному Т-истощенному миелотрансплантату способствует формированию толерантности к донорским клеткам и установлению клеточного химеризма.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** трансплантация, лимфоциты, костный мозг

В настоящее время трансплантация гемопоэтических стволовых клеток широко используется для лечения различных форм лейкозов, лимфопролиферативных заболеваний, аплазий кроветворной ткани, наследственных метаболических нарушений, тяжелых иммунодефицитных состояний. Трансплантация является единственным эффективным способом восстановления гемопоэза и иммуногенеза после общего облучения организма в высоких дозах. Терапевтический эффект применения гемопоэтической ткани в значительной мере зависит от степени гистосовместимости реципиента и трансплантата, клеточного состава трансплантата, функциональной и метаболической активности его клеток. Во многих случаях, включая наследственную патологию, возможна трансплантация только аллогенной ткани. Однако ее применение всегда связано с риском развития таких серьезных осложнений, как реакция трансплантат-против-хозяина (РТПХ) и хозяин-против-трансплантата (РХПТ). Это угрожает отторжением трансплантата и развитием панцитопении, приводящим к летальному исходу. Избежать этого можно путем создания условий, при которых будет гарантировано развитие толерантности реципиента к донорским клеткам и становление стабильного клеточного химеризма. По нашему мнению, одним из таких подходов к решению данной проблемы может стать конструирование трансплантата с особыми свойствами: наименьшей иммуноагрессивностью, и, напротив, повышенными репопуляционной активностью и толерогенностью.

Целью данной работы явилось изучение влияния обогащения аллогенного миелотрансплантата В-лимфоцитами на восстановление основных параметров

костного мозга облученных реципиентов и развитие РТПХ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальными реципиентами трансплантата служили самки мышей линии СВА 8-10-недельного возраста массой 20-22 г. Животных облучали в дозе 9 Гр на установке РУМ-17 (38,6 р/мин, при напряжении 220 кВ, силе тока 10 мА, фильтре 1 мм Си + 1 мм Al, кожно-фокусном расстоянии 60 см). Источником клеток костного мозга (ККМ) и В-лимфоцитов служили мыши-самцы линии С57Bl 8-10-недельного возраста массой 20-22 г.

ККМ получали из бедренных костей. Удаление Т-лимфоцитов из суспензии ККМ производили путем ее обработки анти-Thy 1,2-сывороткой и комплементом [1]. Погибшие клетки удаляли с помощью центрифугирования клеточной суспензии на градиенте плотности фикола-верографина 1,090 [2].

В-лимфоциты выделяли из селезенок животных. Выделив на градиенте плотности фикола-верографина лимфоциты, обрабатывали их анти-Thy 1,2-сывороткой и комплементом. От погибших клеток извлекались по методу [2].

ККМ, истощенные по Т-клеткам и сингенные им В-лимфоциты трансплантировали реципиентам в дозе  $5 \times 10^6$  на мышь в первые 6-8 часов после облучения.

Были сформированы следующие группы животных:

1 группа – облученные реципиенты +  $5 \times 10^6$  Т-истощенных аллогенных ККМ;

2 группа – облученные реципиенты +  $5 \times 10^6$  Т-истощенных аллогенных ККМ +  $5 \times 10^6$  аллогенных В-лимфоцитов;

3 группа – облученные реципиенты +  $5 \times 10^6$  сингенных ККМ интактных животных;

4 группа – интактные необлученные мыши СВА.

Основные морфофункциональные параметры костного мозга (абсолютное содержание ядросодержащих клеток, лимфоцитов, колониеобразующих единиц (КОЕс) в бедренной кости, популяционный состав лимфоцитов в костном мозге, их активность в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) исследовались на 10, 15, 20, 30, 45 сутки после трансплантации.

Содержание КОЕс в костном мозге облученных животных изучали методом Till, McCulloch, 1961 [3]. Колонии в селезенках подсчитывали микроскопически после фиксации их в растворе Буэна. Тип гемопоэтических колоний определяли на гистологических препаратах, приготовленных из органов.

О приживлении и активном пролиферировании донорских клеток самцов С57В1 в организме реципиентов (самок СВА) судили, используя метод метафазных пластин, учитывая клетки, содержащие донорскую Y-хромосому самцов [4].

Относительное содержание лимфоцитов в костном мозге определяли микроскопически в мазках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Абсолютное количество лимфоцитов в костном мозге подсчитывали на основании абсолютного числа ядросодержащих клеток костного мозга и относительного содержания в нем лимфоцитов.

Популяционный состав лимфоцитов костного мозга изучали методом иммунофлюоресценции, используя анти- $\mu$  и анти-Thy 1,2 антитела, меченные ФИТЦ [5,6].

Влияние лимфоцитов, генерируемых костным мозгом облученных животных, на развитие РТПХ и РХПТ было изучено в двунаправленной СКЛ [7]. Реакцию проводили в микроварианте в планшете Cook. Для проведения реакции использовали лимфоциты селезенки интактных мышей СВА и С57В1. К смеси эквивалентных количеств ( $5 \times 10^4$ ) этих клеток добавляли такое же количество лимфоцитов костного мозга облученных реципиентов. Смешанную культуру клеток инкубировали при  $T=37^\circ\text{C}$  с автоматической подачей 5%  $\text{CO}_2$  в течение 120 часов. После окончания инкубации в каждую лунку вносили 37 кБк  $^3\text{H}$ -тимидина. Через 16 часов после внесения тимидина суспензии переносили на милипоровые

фильтры и обрабатывали в соответствии с инструкцией. Активность включения  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки измеряли на  $\beta$ -счетчике «Вестман-7800» (Австрия), результат реакции клеток в СКЛ выражали в абсолютных величинах (имп/мин). Контролем служили СКЛ, в которые не вносили лимфоциты облученных животных.

В экспериментах было использовано по 57-60 самок-реципиентов СВА (в интактном контроле – 20 животных) для каждой группы, 25 самцов С57В1 – доноров миелокарицитов и лимфоцитов для 1 и 2 групп, 12 самцов СВА – доноров миелокарицитов для 3 группы.

При статистическом анализе результатов использовали параметрические методы. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей применяли t-критерий

Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные приведены в виде среднего арифметического значения  $M$  и среднеквадратичного отклонения  $\sigma$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что добавление к аллогенному миелотрансплантату, истощенному по Т-клеткам, сингенных В-лимфоцитов (аллогенных реципиенту) оказывает потенцирующее влияние на восстановление костного мозга облученных реципиентов, накопление в органе пула лимфоидных клеток, восстановление числа гемопоэтических стволовых клеток (КОЕс) (табл. 1, 2, 3). Такие реципиенты по темпам репопуляции костного мозга опережали животных, получивших Т-истощенный миелотрансплантат, приближаясь к реципиентам интактных миелокарицитов. У животных, получивших аллогенный лимфомиелотрансплантат, и реципиентов сингенного интактного миелотрансплантата восстановление клеточности костного мозга, содержания в нем лимфоидных клеток и КОЕс происходило к 30-м поттрансплантационным суткам, тогда как у реципиентов Т-истощенного алломиелотрансплантата в этот период данные параметры костного мозга составляли 64-80% от нормы. При этом в наибольшей степени задерживалось восстановление лимфоидного пула клеток.

Таблица 1

**Численность ядросодержащих клеток ( $\times 10^6$ ) в костном мозге облученных животных после трансплантации аллогенных ККМ, истощенных по Т-клеткам, per se (1) и в сочетании**

**с В-лимфоцитами (2) (M±σ)**

Сутки после трансплантации	Группы животных		
	1	2	3
10	3,1±0,3	4,9±0,5*	6,0±0,4**
15	4,8±0,5	7,3±0,7*	10,2±0,6**
20	5,9±0,6	8,9±0,9*	11,8±0,7**
30	10,2±1,1	14,1±1,2*	15,9±1,1**
45	9,1±1,0	14,5±1,1*	15,1±1,1**

Примечания: 1. Количество ядросодержащих клеток в бедренной кости нормальных интактных мышей составляет  $(14,8 \pm 0,7) \times 10^6$ .

2. \* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ );

\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 3 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**Абсолютное содержание лимфоидных клеток ( $\times 10^6$ ) в костном мозге облученных животных после трансплантации аллогенных ККМ, истощенных по Т-лимфоцитам, per se (1) и в сочетании с В-лимфоцитами (2) (M±σ)**

Сутки после трансплантации	Группы животных		
	1	2	3
10	0,07±0,005	0,41±0,04*	0,48±0,03**
15	0,29±0,02	0,83±0,07*	0,93±0,09**
20	0,56±0,04	1,09±0,12*	1,22±0,14**
30	1,76±0,16	2,48±0,21*	2,86±0,20**
45	1,51±0,16	2,77±0,20	2,75±0,19**

Примечания: 1. Количество лимфоидных клеток в одной бедренной кости нормальных интактных животных составляет  $(2,73 \pm 0,15) \times 10^6$ .

2. \* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ );

\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 3 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3

**Абсолютное содержание КОЕс и тип гемопоэтических колоний в костном мозге облученных животных после трансплантации аллогенных ККМ, истощенных по Т-лимфоцитам, per se (1) и в сочетании с В-лимфоцитами (2) (M±σ)**

Сутки после трансплантации	Группы животных	Абсолютное число КОЕс	Э/М колоний	Недифференцированные колонии, %
10	1	34,8±3,9	3,0	57,6
	2	48,5±4,3*	2,7	41,3*
	3	65,8±7,3**	2,3**	30,1**
15	1	258,9±26,1	2,8	51,4
	2	294,2±30,0	2,5	34,0*
	3	347,1±32,4**	2,0**	26,2**
20	1	636,9±64,5	2,6	32,5
	2	736,4±73,8	2,4	23,1*
	3	825,9±71,1**	2,1**	15,8**
30	1	1301,5±137,6	2,6	22,3
	2	1507,1±160,7	2,5	11,0*
	3	1646,3±136,6**	2,4	10,0**
45	1	1290,6±129,7	2,1	29,4
	2	1593,4±143,4*	2,3	10,1*
	3	1623,1±151,2**	2,3	8,3**

Примечания: 1. Количество КОЕс в костном мозге нормальных интактных животных составляет  $1630,0 \pm 101,0$ , соотношение эритроидных и миелоидных колоний (Э/М) – 2,3, содержание недифференцированных колоний – 7,6%.

2. \* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ );

\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 3 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ ).

Обращает внимание, что к концу эксперимента (45-м посттрансплантационным суткам) у животных, получивших аллогенные Т-истощенные ККМ, наблюдается снижение клеточности костного мозга и содержания лимфоцитов по сравнению с предыдущим этапом (30-е сутки), что может свидетельствовать о развитии иммунного конфликта между аллогенными донорскими клетками и организмом реципиента.

Цитогенетическое исследование ККМ облученных реципиентов 1 и 2 групп показало, что на 10-15-е сутки репопуляция органа происходит за счет исключительно

донорских миелокариоцитов, несущих маркерную Y-хромосому. На 20-45-е сутки среди ККМ регистрируются миелокариоциты реципиентского происхождения. На 20-е сутки после трансплантации у животных 1 группы их содержание составляло 3%, у животных 2 группы – 7%; на 30-е сутки – 6 и 13% соответственно; на 45-е сутки – 15 и 17%.

Анализ фенотипического состава лимфоцитов облученных реципиентов определил, что у животных 1 и 2 групп они были представлены пре-В-лимфоцитами ( $sm^+$ ), зрелыми В-лимфоцитами ( $sm^+$ ) и ноль-лимфоцитами (табл. 4). Thy 1,2-лимфоциты у

животных этих групп до 20-х суток отсутствовали, на 30-е сутки их количество составляло 0,9-1,3%, на 45-е сутки – 3,0-3,1%. Характерным является то, что у животных, получивших комбинированный трансплантат, темпы созревания В-лимфоцитов значительно выше, чем у реципиентов, получивших Т-истощенный миелотрансплантат и животных-реципиентов интактных сингенных миелокариоты.

Изучение функциональной активности лимфоцитов костного мозга показало, что с 20-х посттрансплантационных суток у животных 2 группы, в отличие от животных 1 группы, появляются лимфоциты с супрессорными свойствами. Будучи добавленными в двунаправленную СКЛ, в которой отвечающими и стимулирующими клетками выступают интактные клетки донорского генотипа и реципиентов, эти лимфоциты вызывают усиление реакции на 90% (табл. 5). У реципиентов аллогенного лимфомиелотрансплантата в течение всего периода наблюдения также не отмечалось развития спленомегалии как признака развития РТПХ. Напротив, для реципиентов

аллогенных ККМ, истощенных по Т-клеткам, спленомегалия была характерным явлением, регистрируясь у всех животных на 45-е сутки после трансплантации.

Учитывая, что у реципиентов лимфомиелотрансплантата в течение всего посттрансплантационного периода наблюдался динамичный рост клеточности костного мозга, КОЕ, восстановления лимфоидного пула, а также отсутствие спленомегалии, можно констатировать, что в ситуации пересадки аллогенных ККМ совместно с В-лимфоцитами у реципиентов не наблюдается развития иммуноконфликта, способного влиять на восстановление гемо- и лимфопоэза. Можно заключить, что обогащение В-лимфоцитами аллогенного Т-истощенного миелотрансплантата способствует формированию толерантности к клеткам донора и становлению клеточного химеризма. Это приводит к устойчивому приживлению донорских клеток и, как следствие, стабилизации гемо- и иммунопоэза.

Таблица 4

**Популяционный состав лимфоцитов костного мозга облученных животных после трансплантации аллогенных ККМ, истощенных по Т-лимфоцитам, per se (1) и в сочетании с В-лимфоцитами (2) (М±σ)**

Сутки после трансплантации	Группы животных	Относительное содержание клеток, %			
		ср <sup>+</sup> ср <sup>-</sup>	сп <sup>+</sup>	Thy 1,2 <sup>+</sup>	Ноль-клетки
10	1	32,0±1,6	5,2±0,4	-	55,8±2,3
	2	46,5±2,1*	16,6±0,9*	-	36,9±1,8*
	3	36,0±1,5**	9,9±0,5**	6,3±0,2**	47,8±2,1
15	1	32,6±1,7	7,3±0,4	-	60,1±3,1
	2	40,6±1,8*	31,0±1,9*	-	28,4±1,6*
	3	37,7±1,6	16,1±0,8**	6,1±0,2**	40,1±1,6**
20	1	33,4±1,8	14,5±0,8	-	52,1±2,7
	2	35,1±1,9	36,1±1,9*	-	28,8±1,6*
	3	37,4±1,8	21,4±1,3**	5,1±0,2**	36,1±1,9**
30	1	33,1±1,6	26,1±1,4	1,3±0,1	39,5±2,1
	2	32,4±1,5	38,6±2,1*	0,9±0,01	28,1±1,5*
	3	35,7±1,4	34,1±1,9**	2,6±0,1**	27,6±1,2**
45	1	31,8±1,8	29,1±1,5	3,0±0,1	36,1±2,0
	2	30,9±1,6	39,7±2,2*	3,1±0,1	26,3±1,6**
	3	29,6±1,4	40,5±2,0**	3,2±0,1	26,7±1,3**

Примечания: 1. Популяционный состав лимфоцитов костного мозга нормальных интактных животных: ср<sup>+</sup> ср<sup>-</sup> клетки – 29,2±1,2%, ср<sup>+</sup> клетки – 40,1±2,0%, Thy 1,2<sup>+</sup> клетки – 3,3±0,1%, ноль-клетки – 27,4±1,2%.

2. \* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 (p<0,05);

\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 3 по сравнению с показателями животных группы 1 (p<0,05).

Таблица 5

**Влияние лимфоцитов костного мозга облученных животных после трансплантации аллогенных ККМ, истощенных по Т-лимфоцитам, per se (1) и в сочетании с В-лимфоцитами (2), на реакцию клеток в СКЛ (М±σ)**

Сутки получения лимфоцитов из костного мозга облученных животных	Уровень включения <sup>3</sup> H-тимидина в СКЛ, имп/мин	
	1	2
10	50123±6031	50123±5124
15	49673±4836	4974±506*
20	49715±5034	3789±403*
30	48165±5165	3784±401*
45	54073±5581	3491±396*

Примечания: 1. Уровень включения <sup>3</sup>H-тимидина в СКЛ (лимфоциты СВА+лимфоциты C57Bl)(контроль) - 50067±5286.

2. 1 – СКЛ (лимфоциты СВА+лимфоциты С57В1+лимфоциты облученных реципиентов 1-й группы); 2 – СКЛ (лимфоциты СВА+лимфоциты С57В1+лимфоциты облученных реципиентов 2-й группы).  
 3. \* - достоверность отличий показателей 1 по сравнению с показателями 2 ( $p<0,05$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Обогащение В-лимфоцитами аллогенного миелотрансплантата оказывает стимулирующий эффект на восстановление КОЕ, ядродержащих клеток, лимфоцитов костного мозга летально облученных реципиентов.
1. Обогащение аллогенного миелотрансплантата, истощенного по Т-клеткам, В-лимфоцитами способствует становлению клеточного химеризма в организме реципиента, оказывая на него толерогенное влияние.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин А.Б., Пинегин Б.В., Орлов Э.В. и др. // Иммунология. - 1986. - №2. - С. 31-34.
2. Davidson W.F., Parish C.R. // J.Immunol.Meth. - 1975. - Vol.7. - №2-3. - P. 291-300.
3. Till J.E., McCulloch E.A. // Radiation Res. - 1961. - Vol.14. - №12. - P. 213-233.
4. Получение хромосомных препаратов лимфоидных клеток / Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть. -К.:Выща школа. - 1989. - С. 254-264.
5. Pietrangeli C.E., Osmond D.G. // Cell Immunol. - 1987. - Vol.107. - №2. - P. 348-357.
6. Goldshneider J. // Cell Immunol. - 1976. - Vol. 24. - № 2. - P. 289-307.
7. Зарецкая Ю.М. Смешанная культура лимфоцитов / Клиническая иммуногенетика. -М.: Медицина. - 1983. - С.47-50.

## ВПЛИВ В-ЛІМФОЦИТІВ НА ВІДНОВЛЕННЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ ОПРОМІНЕНИХ РЕЦИПІЄНТІВ АЛОГЕННОГО МІЕЛОТРАНСПЛАНТАТУ

*М.М. Попов<sup>1</sup>, О.А. Романова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України», м. Харків

## РЕЗЮМЕ

Метою роботи було вивчення впливу збагачення алогенного міелотрансплантату В-лімфоцитами на відновлення гемопоєзу та імуногенезу опромінених реципієнтів та можливість розвитку в них РТПХ. Показано, що застосування В-лімфоцитів сумісно з міелокаріоцитами справляє стимулюючий ефект на відновлення КУО, ядромістких одиниць, лімфоцитів кісткового мозку летально опромінених реципієнтів. Додавання В-лімфоцитів до Т-виснаженого міелотрансплантату сприяє формуванню толерантності до донорських клітин і встановленню клітинного хімеризму.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** трансплантація, лімфоцити, кістковий мозок

## INFLUENCE OF B-LYMPHOCYTES ON BONE MARROW RECOVERY OF THE IRRADIATED RECIPIENTS OF ALLOGENIC MIELOTRANSPLANT

*N.N. Popov<sup>1</sup>, E.A. Romanova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

<sup>2</sup>State establishment «I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine», Kharkiv

## SUMMARY

The study of influencing of enriching allogenic mielotransplant by B-lymphocytes on recovery of hemopoiesis and immunogenesis of the irradiated recipients and possibility of development at them GVHD was the purpose of work. It is rotined that application of B-lymphocytes is joint with mielocariocytes renders a stimulant effect on renewal total organcellularity, number of CFU, lymphocytes of bone marrow of the lethally irradiated recipients. Adding of B-lymphocytes to allogenic T-depleted mielotransplant is instrumental in forming of tolerance to the donor cells and establishment of cellular chimerism.

**KEY WORDS:** transplantation, lymphocytes, bone marrow